第34卷 第4期
1991年11月

昆虫学报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 34, No. 4
Nov., 1991

家蚕五龄幼虫血淋巴内维生素的研究

臧荣春　马志超
（浙江农业大学，杭州 310029）

摘要　本实验对家蚕 *Bombyx mori* 五龄健康的雌雄幼虫、氟中毒的雌幼虫、细胞质多角体病毒(CPV)感染的雄幼虫血淋巴内的烟酸、烟酰胺、吡哆辛 (VB_6)、硫胺素 (VB_1) 及核黄素 (VB_2) 含量，采用离子对反相色谱法进行了定量测定。在五龄幼虫发育阶段，血淋巴内每种维生素含量均是雌蚕高于雄蚕，健康者高于病态者，且病蚕含维生素的量持续下降；烟酸和烟酰胺浓度一直减少，可能是部分烟酸、烟酰胺在酶作用下与某些蛋白质结合，部分烟酸、烟酰胺形成 NADP 酶的缘故；VB_6、VB_1 和 VB_2 浓度增加，是幼虫大量摄食、贮存能量和营养，供日后生命循环需要的结果。

关键词　家蚕　维生素　血淋巴

在家蚕 *Bombyx mori* 和其它昆虫的生长发育过程中，对维生素的需求量虽少，但却是调节生理机能不可缺少的。维生素在细胞的代谢过程中起着重要作用。家蚕本身不能合成维生素，靠从食物中摄取(南开大学等，1980)。维生素在昆虫(包括家蚕)体内的组成、含量以及与昆虫性别、健康状态、各生长发育阶段诸因素间的数量关系，迄今未见国内外有过较全面的研究报道。

细胞质多角体病毒 (CPV) 引起的中肠性浓病是家蚕的常见疾病。近几年来，大气氟污染在浙江的蚕桑产区已造成了较严重的损失，引起普遍关注。家蚕氟中毒或 CPV 感染后对体内维生素的组成和浓度的影响，是值得研究的。本文采用液相色谱方法分析五龄家蚕健康的雌雄幼虫、氟中毒雌幼虫、CPV 感染雄幼虫血淋巴内的烟酸、烟酰胺、吡哆辛 (VB_6)、硫胺素 (VB_1) 及核黄素 (VB_2) 的含量，同时探讨了从五龄起蚕到熟蚕的发育阶段中，各维生素含量变化趋势和可能的内在原因。

材料和方法

一、供试虫源

家蚕品种　浙农1号×苏12。在27℃的饲养室内用干净的湖桑197的桑叶饲养。

二、家蚕幼虫血淋巴样品的采集

选一批大小均匀、发育整齐健康的四龄幼虫，五龄饷食前进行雌雄鉴别。雌蚕分两组饲养，一组对照，一组添食100 ppm 的氟化钠；雄蚕也分成两组，一组对照，一组添食每毫升含 1.9×10^5 的多角体。然后在幼虫的尾角处用注射器抽取血淋巴。采血时间分别为五龄起蚕、第3、5、7和第9天(熟蚕)。采样时，预先在聚乙烯塑料试管内加入少量苯基硫脲和柠檬酸钠，防止血淋巴凝结、颜色变黑。采血后立即用 Parafilm 薄膜封住试管口，样品混匀，避光保存在 −30℃ 的冰箱内。

本文于1989年5月收到。

三、维生素的抽提

从家蚕幼虫血淋巴中提取多种维生素的方法以 Kimura 等(1982)、Ichinose 等(1985)、Vanderslice 等(1981)、Takikawa 等(1982)和 Gimsing (1983)诸方法的总括。样品前处理和分析测试过程中尽可能避光。2 ml 血淋巴以 1500 rpm 的转速在 4℃下离心 10 分钟,倾倒出上层血浆,下层凝块用 1% NaCl 溶液 0.5 ml 混匀,再次离心,合并两次上清液。1 ml 上清液用醋酸和 2 mol/L NaOAc 溶液调节 pH 值约为 4.5,加入少量粉末状淀粉酶和维生素 C 混匀,在 35℃ 下缓慢振荡过夜。上述样品试液再经超声波抽提 30 分钟后,加入 0.25 ml 50% Cl_3CCOOH 和 0.5 ml 2mol/L 的 EDTA 溶液混匀,静置 10 分钟后,用 2mol/L NaOAc 调节 pH 值到 7,并用蒸馏水定容成 5ml。以 15000rpm 的转速在 −4℃ 下离心 12 分钟,小心倾倒出上清液。2 ml 上清液缓缓地通过经活化的 Sep-pak C_{18} 微柱,用 2ml 65% 的甲醇溶液洗脱,弃去前 0.5 ml 洗脱液,收集其余洗脱液供反相离子对高效液相色谱法定量测定。

四、维生素的定量分析

我们基本采用 Dong 等(1988)应用反相离子对色谱法同时测定多种水溶性维生素的方法,并作了一些改进以适合分析家蚕幼虫血淋巴抽提液中的维生素,如 VC、烟酸、烟酰胺、VB_6、叶酸、VB_2、VB_1 和 VB_{12} 的测定。使用 Waters 液相色谱仪,用 8mm×10 cm Waters Radial Pak C_8 柱和 Guard Pak C_{18} 预柱。多波长紫外光和荧光检测:UV254nm 检测 VC、烟酸、烟酰胺及 VB_1, 290nm 检测叶酸及 VB_6, 365nm 检测 VB_{12};专一的荧光检测 VB_2 (λ_{ex} = 365nm, λ_{em} = 520nm),使维生素各在其高灵敏度下检测。用冰醋酸调节 pH 为 3.06 的 16% 的甲醇水溶液(内含 PIC B7 3.75 mol/L, PIC B5 1.25 mol/L, 0.25% 的 TEA)作流动相,流速为 2.0 ml/分钟。

结果和讨论

图 1 是维生素标准溶液和家蚕五龄幼虫血淋巴维生素提取液的典型色谱图。由图看出,荧光检测灵敏度远高于紫外光检测。在采用紫外光检测样品液中的 VB_2 时,VB_2 峰与样品中浓度很大的未知物峰迭合,无法定量。同时对 VB_2 采用专一的荧光检测方法,就排除了干扰。

表 1 列出了健康雌雄家蚕、氟中毒雌蚕、CPV 感染雄蚕在五龄幼虫发育期间血淋巴内维生素的液相色谱分析结果。在本文的分析方法里,VC 作为抗氧化剂加入血淋巴内,未定量;泛酸未测定;VB_{12} 和叶酸未检出。

从图 2 到图 3 看出,雌蚕幼虫血淋巴内维生素含量高于雄蚕,这与血淋巴内的总氮量、氨基酸含量的情形相同(吴载德,1980)。氟中毒或 CPV 感染后,幼虫血淋巴内维生素含量较相应的健康幼虫低,且一直下降。家蚕新陈代谢所需维生素靠从食物中摄取。家蚕氟中毒或 CPV 感染后,食物摄取量减少,机体的吸收转化功能衰退。随着时间延长,症状加重,以至于不动、不摄食,甚至死亡(如 CPV 感染幼虫,第 8 天已死亡)。幼虫血淋巴内维生素含量逐日下降,是病症加重的必然结果。实际上最后两三天检测到的维生素是机体未能吸收转化的残余量。

家蚕五龄幼虫血淋巴内的烟酸、烟酰胺含量以及烟酸和烟酰胺总量,随着幼虫从起蚕

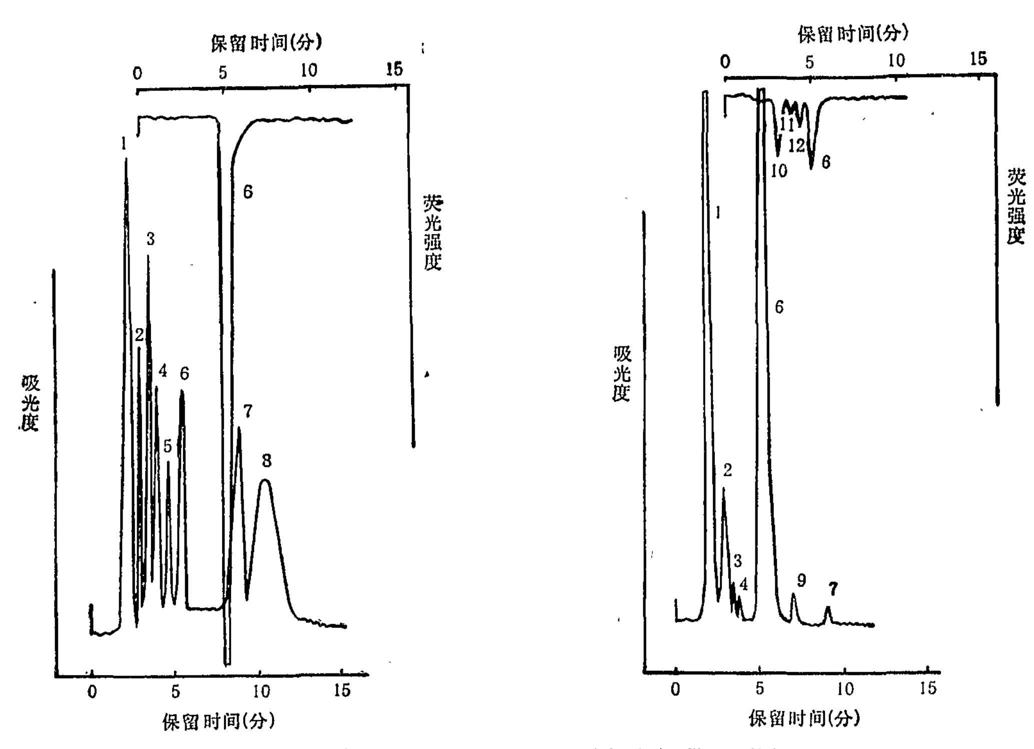


图 1 维生素标准液（A）和家蚕血淋巴维生素提取液（B）的液相色谱图

1.VC 2.烟酸 3.烟酰胺 4.VB_6 5.叶酸 6.VB_2 7.VB_1 8.VB_{12} 9.10.11.12.未知物峰

表 1 家蚕五龄幼虫血淋巴内维生素含量的 HPLC 测定结果*(单位：μg/ml)

天数	健康雌蚕					氟中毒雌蚕				
	1	3	5	7	9	1	3	5	7	9
烟酸	8.672	8.502	6.713	6.481	5.324	8.334	6.618	3.556	2.246	1.297
烟酰胺	6.152	5.807	4.939	3.806	1.808	3.643	2.168	1.995	1.896	0.938
VB_6	3.703	3.894	4.085	4.180	4.304	2.923	2.533	2.203	1.728	1.072
VB_2	1.561	1.041	1.294	1.478	1.496	1.176	0.773	0.694	0.560	0.392
VB_1	ND	0.675	1.126	5.620	6.229	0.039	0.467	0.559	0.409	0.205

天数	健康雄蚕					CPV 感染雄蚕				最大偏差	最大变异系数(%)
	1	3	5	7	9	1	3	5	7		
烟酸	6.482	5.278	4.704	4.398	3.704	5.314	4.279	2.728	0.833	0.91	23.44
烟酰胺	5.986	4.363	3.470	2.428	1.392	3.418	2.053	1.652	1.293	0.58	16.07
VB_6	3.118	3.259	3.568	3.811	4.041	2.634	2.436	1.948	1.279	0.44	15.11
VB_2	1.344	0.840	0.890	1.244	1.352	1.019	0.688	0.455	0.205	0.73	31.20
VB_1	0.532	2.865	3.034	3.621	4.346	0.5762	2.086	2.231	0.904	0.86	32.14

* 本表数据为三次重复测定的平均值

到熟蚕的生长发育，逐日下降(图 2)。昆虫体内的烟酰胺、烟酸在酶的作用下形成辅酶 I [烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）]、与辅酶 II [烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$）]。辅酶与多种蛋白结合，催化机体代谢过程中所进行的多类氧化还原反应（Hengen 和

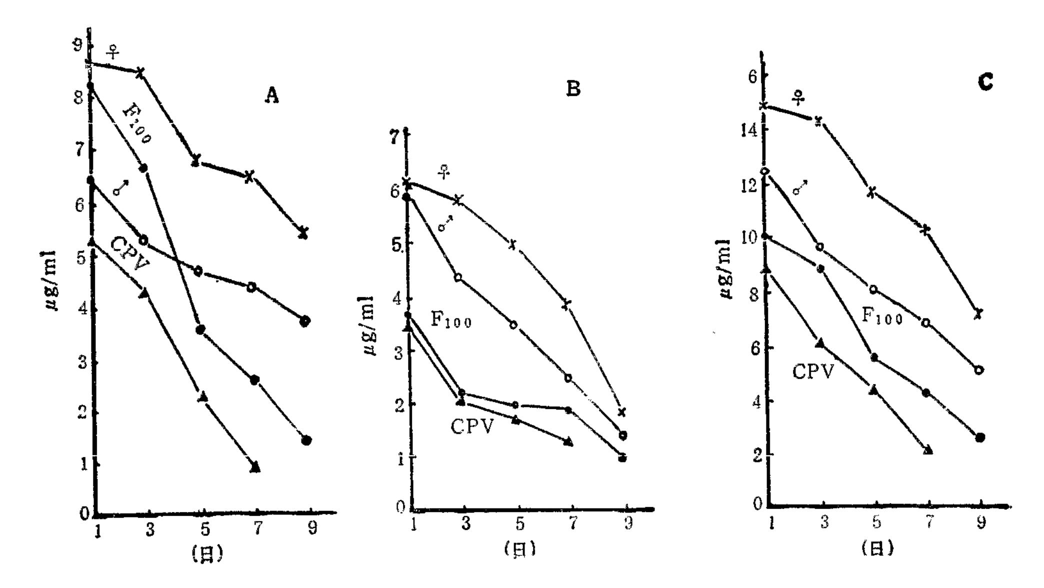


图 2　五龄发育阶段家蚕幼虫血淋巴内烟酸 (A) 烟酰胺 (B) 烟酸和烟酰胺(C)总量逐日变化情况
♀: 健康雌蚕　♂: 健康雄蚕　F_{100}: 氟中毒家蚕　CPV:CPV 感染家蚕

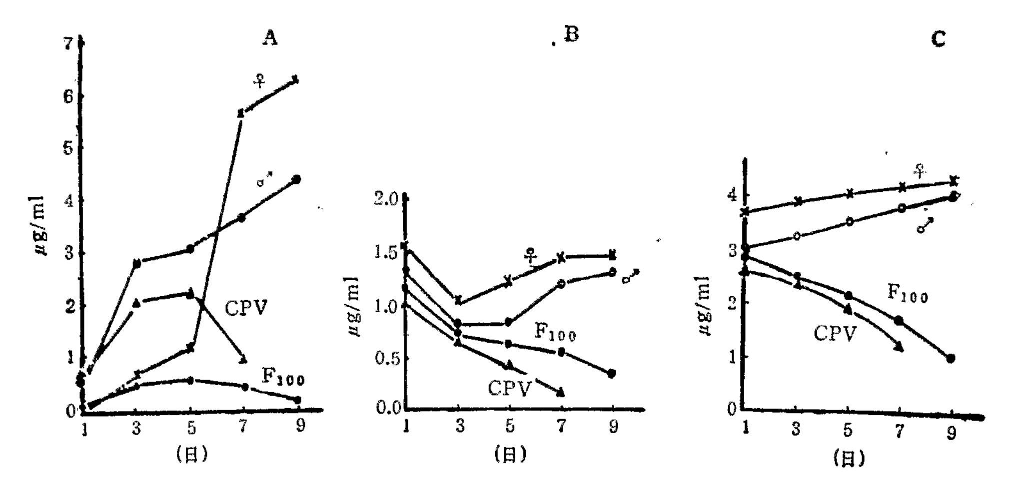


图 3　五龄发育阶段家蚕幼虫血淋巴内 VB_1(A)、VB_2(B)、VB_6(C) 浓度逐日变化情况
图示注解同图 2

Vries, 1985)。同时,氧化性的 NADP 酶提供 NADPH, 用来合成脂肪酸,贮存于脂肪体内 (Geer 和 Perille, 1977)。已经知道, 五龄期间家蚕幼虫血淋巴内蛋白质含量、丝腺内蛋白质含量以及腹部脂肪体内的干物质(主要是脂肪)逐日上升(吴载德, 1980)。在此期间,血淋巴内烟酸、烟酰胺浓度逐渐下降,很可能是家蚕将从食物中摄取的烟酸、烟酰胺在酶的作用下形成辅酶。一部分辅酶与某些蛋白质结合, 另一部分辅酶形成氧化性的 NADP 酶;而我们的样品前处理方法不能或不完全能使键合的烟酸、烟酰胺变成游离态。这种结合趋势增加,导致了易游离的烟酸、烟酰胺含量的减少。该设想还有待同位素标记实验来确证。

与烟酸、烟酰胺的情况不同，五龄家蚕幼虫血淋巴内 VB_6、VB_1 浓度随幼虫的生长发育逐日增加；VB_2 浓度起初下降，第 3 天后呈上升(图 3)。昆虫从食物中摄取 VB_1、VB_2 及 VB_6 后，在体内形成各自的辅酶，在机体的代谢过程中发挥作用(南开大学等，1980)。因家蚕自上簇后的生命循环进程中已不再摄取食物，在这期间机体新陈代谢所需营养(包括维生素)和能量，是靠幼虫阶段，特别是五龄期间大量摄食积累贮存起来的营养和能量物质来提供的。五龄幼虫血淋巴内 VB_1、VB_2 及 VB_6 浓度逐日增加，是家蚕积累营养和能量的必然结果。

参　考　文　献

吴载德　1980　蚕体解剖生理学。63、78、109 页。农业出版社。

南开大学等　1980　昆虫学(下册)。第 31—32 页。高等教育出版社。

Dong, M. W. et al 1988 Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. *J. Chromatography* 442: 81—9.

Geer, B. W. & T. J. Perille 1977 Effects of dietary sucrose and environmental temperature on fatty acid synthesis in *Drosophila melanogaster. Insect Biochem.* 7: 371—9.

Gimsing, P. 1983 Determination of cobalamins in biological material. *Anal. biochem.* 129: 296—304.

Henden, N. & J. X. de Vries 1985 Nicotinic and nicotinamide. In: Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins (ed. A. P. de Leenheer et al.) pp 344—6. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel.

Ichinose, N. et al 1985 Determination of B_2 vitamins in serum of fish using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst* 110: 1505—7.

Kimura, M. et al 1982 Liquid chromatographic determination of the total thiamine content of blood. *Clin. Chem.* 28: 29—31.

Takikawa, K. et al 1982 A high performance liquid chromatographic method for purification analysis of niacin and niacinamide from blood. *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.)* 233: 343—8.

Vanderslice, J. T. et al 1981 Extraction and quantitation of B_6 vitamins from animal tissues and human plasma. *Amer. J. Clin. Chem.* 34: 947—52.

A STUDY ON VITAMINS IN THE HEMOLYMPH OF FIFTH INSTAR LARVAE OF *BOMBYX MORI*

ZANG RONG-CHUN　　MA ZHI-CHAO

(Instrumentation Center, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

The ion-pair reversed chromatographic method was applied to analyse niacin, niacinamide, pyridoxine (vitamin B_6), thiamine (vitamin B_1) and riboflavin (vitamin B_2) in the hemolymph of the fifth instar larvae of silkworm *Bombyx mori*. They consisted of four groups including healthy males, CPV-infected males, healthy females and fluoride poisoned females. During the fifth instar larval development, the vitamin content in the hemolymph of the healthy larvae was higher than that in the diseased state and there was a continuous decrease in vitamin content in the diseased larvae. It is suggested that a part of niacin and niacinamide has been associated with some proteins under enzymic action and formed NADP-enzyme during the fifth instar larval development, resulting in the gradual decrease of free niacin and niacinamide. At the same time, the increasing amount of vitamin B_6, B_1 and B_2 is due to the requirement of stored nutrients to complete the life cycle of the silkworm.

Key words　*Bombyx mori*——vitamin——hemolymph